

ГЕНЕТИКА КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ ДИКИХ РОДИЧЕЙ

DOI: 10.30901/2227-8834-2017-3-82-90

УДК 575.12:633.854

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

И. Н. Анисимова,
Ю. И. Карабицина,
Н. В. Алпатьева,
Е. Б. Кузнецова,
В. А. Гаврилова,
Е. Е. Радченко

Федеральный исследовательский центр
Всероссийский институт
генетических ресурсов
растений имени Н. И. Вавилова,
190000, Россия,
Санкт-Петербург, ул. Б. Морская
д. 42, 44,
e-mail: irina_anisimova@inbox.ru

Ключевые слова:

ЦМС, восстановление фер-
тильности, гены *Rf*, *RFL-PPR*,
молекулярно-генетические
маркеры

Поступление:

23.07.2017

Принято:

21.08.2017

ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ *RFL-PPR*-ГЕНОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА КАК МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ

Актуальность. В селекции гибридов подсолнечника широко используется цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) РЕТ1-типа. Для восстановления фертильности пыльцы на фоне данного типа стерильности необходимо присутствие в генотипе доминантного аллеля *Rf1*. Молекулярные механизмы признака восстановления фертильности и природа локуса *Rf1* подсолнечника до сих пор не известны. Для позиционного клонирования и создания функциональных маркеров гена *Rf1* могут быть использованы молекулярные маркеры, разработанные на основе *RFL-PPR*-генов, продуктами которых являются PPR-белки, связанные с экспрессией признака восстановления фертильности. Цель настоящего исследования – выяснение возможности использования полиморфных вариантов *RFL-PPR*-генов в качестве молекулярно-генетических маркеров. Материал и методы. Изучена 131 линия генетической коллекции подсолнечника ВИР, в том числе 9 стерильных линий на основе ЦМС РЕТ1 и 122 фертильные линии, различавшиеся по способности к супрессии фенотипа ЦМС при скрещиваниях. Молекулярный анализ выполнен с использованием трех пар праймеров специфичных для ассоциированного с ЦМС РЕТ1 митохондриального локуса *orfH522* и ядерного гена *Rf1*, а также двух пар праймеров, специфичных для гомологов *RFL-PPR*-генов. Для идентификации SNP в последовательностях фрагментов *RFL-PPR*-генов QHL12D20 и B20M13 использовали рестриктазы *HaeIII* и *RsaI*. В F₂ гибрида ВИР116А×ВИР740 анализировали характер наследования признака восстановления фертильности, SCAR-маркеров гена *Rf1* и CAPS-маркера фрагмента QHL12D20. Результаты и выводы. В зависимости от типа цитоплазмона и генотипов по локусу *Rf1* выделены три группы линий: стерильные (ЦМС РЕТ1), фертильные с F цитоплазмой (восстановители и закрепители стерильности) и фертильные с S цитоплазмой (все – восстановители фертильности). Методом гибридологического анализа подтверждено тесное сцепление маркерных фрагментов HRG01 и HRG02 с локусом *Rf1*. У изученных линий обнаружены по два варианта фрагментов QHL12D20 и B20M13, отличающиеся единичными нуклеотидными заменами (SNP), для идентификации которых разработаны CAPS-маркеры. Варианты маркеров L12/*HaeIII*_1 и B20/*RsaI*_1 ассоциированы присутствием в генотипе доминантного аллеля *Rf1*, тогда как L12/*HaeIII*_2 и B20/*RsaI*_2 чаще обнаруживались у носителей рецессивного. Несмотря на то, что у изученных линий варианты последовательностей *RFL-PPR*-генов ассоциированы с аллельным состоянием локуса *Rf1*, в F₂ от скрещивания ВИР16А × ВИР740 фрагмент QHL12D20 наследовался независимо от признака восстановления фертильности пыльцы. *RFL-PPR*-гены могут служить источником молекулярно-генетических маркеров для паспортизации генофонда, молекулярного картирования, а также филогенетических исследований у подсолнечника.

N. Anisimova,
Yu. I. Karbitsina,
N. V. Alpatieva,
E. B. Kuznetsova,
V. A. Gavrilova,
E. E. Radchenko

The N. I. Vavilov
All-Russian Institute
of Plant Genetic Resources
190000, Russia,
42, 44, Bolshaya Morskaya str.,
St. Petersburg
e-mail: irina_anisimova@in-
box.ru

Key words:

CMS, fertility restoration, Rf, RFL-PPR, molecular genetic markers

Received:

23.07.2017

Accepted:

21.08.2017

POLYMORPHIC VARIANTS OF SUNFLOWER *RFL-PPR* GENES AS MOLECULAR GENETIC MARKERS

Background. Cytoplasmic male sterility of PET1 type is widely used in sunflower hybrid seed production. For pollen fertility restoring the presence in the genotype of the *Rf1* dominant allele is necessary. The molecular mechanisms of pollen fertility restoration and the nature of the *Rf1* locus of sunflower are so far unknown. For positioning cloning and developing functional markers of the *Rf1* genes the molecular markers based on *RFL-PPR* genes can be used. The products of *RFL-PPR* genes are the PPR-proteins associated with the expression of pollen fertility restoration trait. The research was aimed to evaluating the possibility for using the *RFL-PPR* genes polymorphic variants as molecular genetic markers. **Materials and methods.** One hundred and thirty one sunflower lines from VIR collection including 9 sterile lines based on CMS PET1 and 122 fertile lines differing by the ability to suppress CMS phenotype in crosses were studied. The molecular analysis was performed with the use of three primer pairs specific for the CMS PET1 associated locus orfH522 and nuclear gene *Rf1*, and also two primer pairs specific for *RFL-PPR* homologs. The restrictases *HaeIII* and *RsaI* were used for the identification of SNPs in the sequences of the *RFL-PPR* gene fragments QHL12D20 and B20M13. The inheritance of pollen fertility restoration trait, presence of the *Rf1* gene SCAR markers and the CAPS marker of the QHL12D20 fragment was analyzed in the F2 hybrid VIR116A×VIR740. **Results and conclusions.** Three groups of lines – the sterile (CMS PET1), the fertile with F cytoplasm (restorers and maintainers), and the fertile with S cytoplasm (all fertility restorers) – were singled out depending on the cytoplasm type and genotypes for the *Rf1* locus. With the use of hybridological analysis a close linkage of the marker fragments HRG01 and HRG02 with the *Rf1* locus was confirmed. In the lines analyzed two variants of each QHL12D20 and B20M13B fragments were revealed which differed by single nucleotide substitutions (SNPs). CAPS markers have been elaborated for identification of the SNPs. The marker variants L12/*HaeIII*_1 and B20/*RsaI*_1 were associated with the presence of the *Rf1* dominant allele whereas the variants L12/*HaeIII*_2 и B20/*RsaI*_2 more often were found among the recessive allele carriers. Despite in lines of sunflower genetic collection the *RFL-PPR* gene variants were associated with the allelic state of the *Rf1* locus, in the F2 hybrid VIR116A × VIR740 the fragment QHL12D20 was inherited independently on the pollen fertility restoration trait. *RFL-PPR* genes can serve as sources of molecular genetic markers for passportization of sunflower gene pool, molecular mapping and also for phylogenetic studies.

Введение

Цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) – наследуемый по материнской линии признак, проявляющийся в неспособности растения продуцировать нормальную (фертильную пыльцу). Явление ЦМС, описанное более чем у 150 видов растений (Ivanov, Dymshits, 2007), широко используется для получения гибридных семян ряда экономически важных сельскохозяйственных культур (кукурузы, рапса, подсолнечника, капусты). ЦМС чаще всего возникает в результате отдаленной гибридизации и обусловлена перестройками митохондриального генома. В большинстве случаев стерильность вызывают абберрантные митохондриальные гены, продукты которых губительны для развития пыльцы. Эффекты ЦМС-генов преодолеваются при введении в генотип функциональных аллелей ядерных генов восстановления фертильности (*Rf* – *Restoration of Fertility*). Селекция гетерозисных гибридов включает создание материнских стерильных линий ЦМС и отцовских линий-восстановителей фертильности, которые несут функциональные (как правило, доминантные) аллели генов *Rf*. Для тестирования родительских линий по признаку способности к супрессии фенотипа ЦМС стерильные линии скрещивают с предполагаемыми восстановителями и полученные гибриды F1 оценивают по признаку фертильности пыльцы. Этот процесс может быть ускорен при использовании функциональных (аллель-специфичных) либо тесно сцепленных с локусами генов *Rf1* молекулярных маркеров. У многих культур возможности разработки таких маркеров ограничены в связи с отсутствием сведений о природе генов восстановления фертильности.

Большинство описанных к настоящему времени генов *Rf* за небольшими исключениями, кодируют PPR-белки, содержащие повторяющиеся вырожденные мотивы из 35 аминокислотных остатков (Pentatricopeptide Repeats, PPR). У цветковых растений семейство PPR-генов, насчитывающее до 600 членов, вовлечено в антероградную/ретроградную регуляцию, обеспечивающую согласованную работу ядерного и органельного геномов. Гены, продукты которых обладают функцией восстановления фертильности, выделены в отдельное подсемейство *RFL-PPR* (*Restoration of Fertility Like-PPR*), характеризующееся высокой изменчивостью и кластерной организацией в геномах

(Fujii et al., 2011). Полагают, что аллель-специфичные маркеры *RFL-PPR*-генов могут быть использованы для позиционного клонирования генов восстановления фертильности, а также для эффективного отбора носителей функциональных аллелей локусов *Rf* (Kaur et al., 2016; Sykes et al., 2016). Кроме того, исключительно высокая скорость эволюции подсемейства *RFL-PPR*-генов (Dahan, Mireau, 2013), а также важная роль ЦМС и восстановления фертильности в формировании новых видов (Rieseberg, Blackman, 2010) позволяют рассматривать их источник молекулярных маркеров для филогенетических исследований.

В селекции подсолнечника используется преимущественно один тип ЦМС – PET1, полученный в результате межвидового скрещивания *Helianthus petiolaris* Nutt. и *H. annuus* L. (Leclercq, 1969). Идентифицирован главный ядерный ген *Rf1*, доминантный аллель которого определяет признак восстановления фертильности пыльцы форм с ЦМС PET1. Молекулярные механизмы признака восстановления фертильности и природа гена *Rf1* подсолнечника до сих пор не известны. Впервые возможность использования в маркер-опосредованной селекции молекулярных маркеров, разработанных на основе полиморфизма геномных последовательностей, гомологичных генам *Rf* других растений, продемонстрировали Б. Ю. с соавторами (Yue et al., 2007). TRAP-маркер, специфичный для локуса QHL12D20, использован для отбора носителей рецессивного аллеля *rf1* из расщепляющейся гибридной популяции кондитерского подсолнечника (Yue et al., 2007). Впоследствии в геноме подсолнечника был идентифицирован ряд последовательностей, предположительно представлявших *RFL-PPR*-гены (Yue et al., 2010) и изучен полиморфизм некоторых из них (Anisimova et al., 2014a). Однако данные о связи между полиморфизмом последовательностей *RFL-PPR*-генов и аллельным состоянием локуса *Rf1* отсутствуют. Цель настоящего исследования – выяснение возможности использования полиморфных вариантов *RFL-PPR*-генов в качестве молекулярно-генетических маркеров у подсолнечника. В задачи работы входило изучение молекулярных маркеров *RFL-PPR*-генов в подборке линий генетической коллекции подсолнечника ВИР и оценка их диагностической ценности для идентификации носителей доминантного и рецессивного аллелей гена *Rf1*.

Материал и методы

Материалом исследования служили 131 линия генетической коллекции ВИР, в том числе 9 стерильных линий на основе ЦМС РЕТ1 и 122 фертильные линии, различавшиеся по способности к супрессии фенотипа ЦМС при скрещиваниях. Наличие признака восстановления фертильности пыльцы оценивали в разные годы путем парных скрещиваний фертильных линий со стерильными тестерными линиями и индивидуальным анализом по потомству F_1 и F_2 .

Изученный материал репродуцирован на филиале Кубанская опытная станция ВИР (Краснодарский край). Расщепляющаяся гибридная популяция F_2 от скрещивания ВИР116А×ВИР740 была высеяна в 2015 г. в Пушкинском филиале ВИР. Проявление признака восстановления фертильности пыльцы оценивали на стадии цветения путем визуального осмотра растений. Листья индивидуальных растений собирали через 4 недели после появления всходов, замораживали, хранили при -20°C и затем использовали для получения ДНК.

Фракции суммарной ДНК были выделены из листьев гибридных растений F_2 и

этилированных семядолей 7-дневных проростков линий с помощью модифицированного протокола, основанного на использовании СТАВ-буфера (Anisimova et al., 2010). Для проведения ПЦР-анализа использовали оригинальные и отобранные из литературных источников праймеры (табл. 1). ПЦР-анализ проводили в соответствии с протоколами, рекомендованными разработчиками праймеров, а также оптимизированными в настоящем исследовании. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в агарозном геле и визуализировали путем окрашивания бромистым этидием. Рестрикционный анализ амплифицированных фрагментов проводили в соответствии с рекомендованными протоколами фирмы-производителя рестриктазы (Thermo Fisher Scientific). В качестве маркеров молекулярного веса использовали 100bp DNA Ladder (Fermentas) и M100bp DNA Ladder (Dialat).

Реактивы для ПЦР получены от фирмы Диалат (<http://www.dialat.ru>) Прочие расходные материалы для проведения ПЦР и электрофореза предоставлены фирмой Хеликон (<http://www.helicon.ru>). Праймеры синтезированы ЗАО Евроген (<http://www.evrogen.ru>).

Таблица 1. Список использованных праймеров
Table 1. List of primers

Праймер (размер продукта ПЦР, пн)	Маркер (тип)	5'-3' последовательность		Ссылка
orfH522 (516)	orfH522 (STS)	F	TGCCTCAACTGGATAAATTCAC	Schnabel et al., 2008
		R	ACCGTTCCTCACGAGTTGAAG	
K13 (454)	HRG01 (SCAR)	F	TATGCATAAATTAGTTATACCC	Hom et al., 2003
		R	ACATAAGGATTATGTACGGG	
Y10 (740)	HRG02 (SCAR)	F	AAACGTGGGAGAGAGGTGG	«»
L12D20 (1170)	L12/ <i>HaeIII</i> (CAPS)	F	GTAAGCAACCCGAGAAAGCA	Anisimova et al., 2014a
		R	AGTTTCCGGTTTTCCTCGTAT	
B20M13 (421)	B20/ <i>RsaI</i> (CAPS)	F	TTGCAAATGCAAAAACATGG	Anisimova et al., 2014b
		R	AAGACCGTGGACCAAAACTG	

Результаты и обсуждение

Для определения генотипов по локусу *Rf1* линии выборки были проанализированы с помощью молекулярных маркеров, ассоциированных с генетической системой ЦМС-*Rf* – STS-маркера orfH522 митохондриального гена, обуславливающего ЦМС РЕТ1, а также SCAR-маркеров HRG01 и HRG02, тесно сцепленных с геном *Rf1*

(табл. 2). Наличие маркера orfH522 рассматривали как свидетельство того, что линия имеет стерильный (РЕТ1) тип цитоплазмона, а присутствие SCAR-маркеров HRG01 и HRG02 указывало на присутствие в генотипе функционального гена восстановления фертильности. Полагали, что все 67 фертильных линий, у которых молекулярным анализом была идентифицирована стерильная

цитоплазма, имеют генотип *Rf1Rf1*, поскольку присутствие доминантного аллеля этого гена является необходимым условием для проявления признака мужской фертильности на фоне цитоплазмона РЕТ1-типа. Для 53 линий этой группы наличие в генотипе доминантного аллеля *Rf1* подтверждено с помощью SCAR-маркеров HRG01 и HRG02.

В то же время у 30 фертильных линий маркер orfH522 отсутствовал, что указывало на фертильный тип их цитоплазмона.

У всех изученных стерильных линий с помощью STS-маркера orfH522 диагностирован стерильный (РЕТ1) тип цитоплазмы, а SCAR-маркеры HRG01 и HRG02 отсутствовали.

Таблица 2. Распределение маркеров, ассоциированных с генетической системой ЦМС-*Rf*, и аллельных вариантов *RFL-PPR*-генов у линий подсолнечника
Table 2. Distribution of markers related to the CMS-*Rf* genetic system and the *RFL-PPR* genes allelic variants among sunflower lines

Линии	Наличие маркеров				
	orfH522	HRG01	HRG02	L12/ <i>Hae</i> III	B20/ <i>Rsa</i> I
Линии ЦМС					
ВИР109А, ВИР110А, ВИР111А, ВИР114А, ВИР116А, ВИР205А, ВИР215А, ВИР151А, ВИР471А	+	-	-	2	2
Фертильные линии с F цитоплазмой					
ВИР387, ВИР721, L 2088, ТА 6463, ВК580*	-	-	-	1	1
ВИР445	-	+	-	1	1
ВИР580, ВИР652, ВИР697, ВИР743, ВИР763	-	+	+	1	1
ВИР165, ВИР449, ВИР450, ВИР453, ВИР501, ВИР648, ВИР665, ВИР636, ВИР692, ВК 47	-	-	-	2	2
ВИР260, ВИР641	-	-	--	1	2
ВИР369, ВИР740	-	+	+	1	2
ВИР136, ВИР747, ВИР787, ВИР826, ВИР834	-	-	-	2	1
Фертильные линии с S (РЕТ1) цитоплазмой					
ВИР726, ВИР799, ВИР653, ВИР696	+	-	-	1	1
ВИР735, ВИР830	+	+	-	1	1
ВИР583, ВИР819	+	-	+	1	1
ВИР197, ВИР234, ВИР378, ВИР437, ВИР581, ВИР630, ВИР633, ВИР634, ВИР635, ВИР655, ВИР656, ВИР658, ВИР682, ВИР684, ВИР699, ВИР758, ВИР764, ВИР765, ВИР767, ВИР772, ВИР773, ВИР778, ВИР789, ВИР833, ВИР835, ВИР841, X 712	+	+	+	1	1
ВИР249, ВИР381, ВИР370, ВИР388	+	-	-	2	2
RII.80, ВИР386, ВИР480, ВИР817	+	+	+	2	2
ВИР729	+	+	-	2	2
ВИР159, ВИР210, ВИР365, ВИР839, ВИР843, ВИР902,	+	-	-	1	2
RII.130, ВИР761, ВИР762, ВИР801, ВИР815,	+	+	+	1	2
ВИР705, ВИР709	+	-	+	1	2
ВИР364	+	-	+	2	1
ВИР376, ВИР438, ВИР490, ВИР644, ВИР700, ВИР703, ВИР759, ВИР768, ВК571	+	+	+	2	1

*Выделены восстановители фертильности

Восемь линий с F-типом цитоплазмы ранее идентифицированы как восстановители фертильности (в таблице 2 обозначены полужирным шрифтом). Для семи из них присутствие гена *Rf1* подтверждено с помощью молекулярных маркеров HRG01 и HRG02. Двадцать две линии этой группы являются закрепителями стерильности и, за исключением линии ВИР445, не имеют маркеров гена *Rf1*.

Другая группа использованных маркеров разработана на основе полиморфизма экспрессируемых последовательностей (EST) *RFL-PPR*-генов. Поскольку у разных видов растений продуктами локусов *Rf* являются PPR-белки, представляло интерес изучить распределение маркеров *RFL-PPR*-генов у генотипов подсолнечника с различной способностью к супрессии фенотипа ЦМС и

оценить характер их совместного наследования с локусом *Rfl*. Предполагалось, что сцепление указанных маркеров с признаком восстановления фертильности, контролируемым доминантным аллелем локуса *Rfl*, либо с маркерами HRG01 и HRG02 может служить доказательством принадлежности последовательностей в этом локусе к подсемейству *RFL-PPR*-генов. Были использованы две группы CAPS-маркеров, разработанных на основе последовательностей EST, отобранных из базы данных секвенированного генома сложноцветных (Compositae Genome Project, <http://cgpdb.ucdavis.edu/>) – L12/*HaeIII* (Anisimova et al., 2014a) и B20/*RsaI* (Anisimova et al., 2014b). Варианты маркеров обусловлены различиями последовательностей в позициях единичных нуклеотидов (SNP), которые могут быть выявлены при обработке амплифицированных фрагментов рестриктазами *HaeIII* и *RsaI*. При сравнительном анализе ранее секвенированных фрагментов QHL12D20, депонированных в банке генов GenBank (NCBI) под номерами KJ450920–KJ450928 (Anisimova et al., 2014a), выявлено сходство нуклеотидных последовательностей варианта 1 и отличие от последовательностей варианта 2. По данным гибридологического анализа, в F1 гибрида ВИР116А×ВИР740 CAPS-маркеры L12/*HaeIII*_1 и L12/*HaeIII*_2, наследовались кодоминантно, а в F2 расщеплялись как аллельные варианты одного локуса (33 L12/*HaeIII*_1 : 59 L12/*HaeIII*_1_2 : 30 L12/*HaeIII*_2; $\chi^2 = 0,28$, $p > 0,1$). Профили фрагментов, полученных после обработки ампликонов QHL12D20 рестриктазами *HaeIII*, *Hinfl*, *BamHI*, также указывали на наличие в геноме подсолнечника двух аллельных вариантов этого фрагмента (рисунок).

В изучаемой выборке линий проанализировали распределение вариантов CAPS-маркеров L12/*HaeIII* и B20/*RsaI* в зависимости аллельного состояния локуса *Rfl*. Все 8 линий-восстановителей с F цитоплазмой (предполагаемый генотип *RflRfl*) имели аллельный вариант L12/*HaeIII*_1, у 6 из них присутствовал вариант B20/*RsaI*_1. Среди 67 восстановителей с S цитоплазмой (*RflRfl*) также преобладали носители аллельных вариантов L12/*HaeIII*_1 и B20/*RsaI*_1 (48 и 45, соответственно). В то же время все 9 стерильных линий с ЦМС PET1-типа (генотип *rflrfl*) характеризовались альтернативными вариантами

L12/*HaeIII*_2 и B20/*RsaI*_2. Результаты анализа расширенной выборки генотипов из 96 линий-восстановителей фертильности, имевших стерильную (PET1) цитоплазму, также указывали на возможную ассоциацию аллельного варианта L12/*HaeIII*_1 с наличием в генотипе доминантного аллеля *Rfl*: маркер L12/*HaeIII*_1 был детектирован у 71 линии (74% от числа проанализированных). Представленные в коллекции ВИР восстановители фертильности, обладающие S-типом цитоплазмона, получены в результате межвидовых скрещиваний линий ЦМС с дикими видами рода *Helianthus*, межлинейных скрещиваний, а также при самоопылении различных коммерческих гибридов (Gavrilova et al., 2014). Можно предположить, что в процессе создания этих линий при отборе носителей доминантного аллеля *Rfl* (его присутствие на фоне стерильного цитоплазмона легко определяется) имел место и ко-отбор определенных аллелей *RFL-PPR*-генов, участвующих в контроле восстановления фертильности.

Для проверки гипотезы о сцеплении локуса *Rfl* с локусом *RFL-PPR*-гена, детектируемым с помощью маркеров L12/*HaeIII*, проведен анализ расщепляющейся гибридной популяции F₂ от скрещивания ВИР116А×ВИР740. Популяция была представлена 95 фертильными и 37 стерильными растениями, что свидетельствовало о моногенном характере расщепления по признаку восстановления фертильности пыльцы ($\chi^2 = 0,64$, $p > 0,1$). Отцовская линия ВИР740 маркирована двумя фрагментами – HRG01 и HRG02. Для определения их диагностической ценности изучили характер совместного наследования признака восстановления фертильности пыльцы, контролируемого локусом и наличия SCAR-маркеров HRG01 и HRG02. Результаты анализа расщепления F₂ по признакам восстановления фертильности пыльцы и наличию молекулярных маркеров свидетельствовали о тесном сцеплении маркерных фрагментов HRG01 и HRG02 с локусом *Rfl* (табл. 3). Маркеры HRG01 и HRG02 были разработаны для другого генетического пула, не родственного линиям ВИР (Ногн et al., 2003). Отсюда, тесное сцепление этих локусов, обнаруженное у линий коллекции ВИР, свидетельствует об их высокой диагностической ценности.

Таким образом, несмотря на то, что у линий подсолнечника генетической коллекции ВИР аллельные варианты последовательностей *RFL-PPR*-генов ассоциированы с

функциональным состоянием локуса *Rfl*, результаты гибридологического анализа не подтвердили гипотезу о сцеплении двух локусов. Это может быть объяснено локализа-

цией этих генов в разных группах сцепления, либо (при условии сцепления локусов) большой протяженностью локуса *Rfl*, а также повышенным уровнем рекомбинации в этом районе.

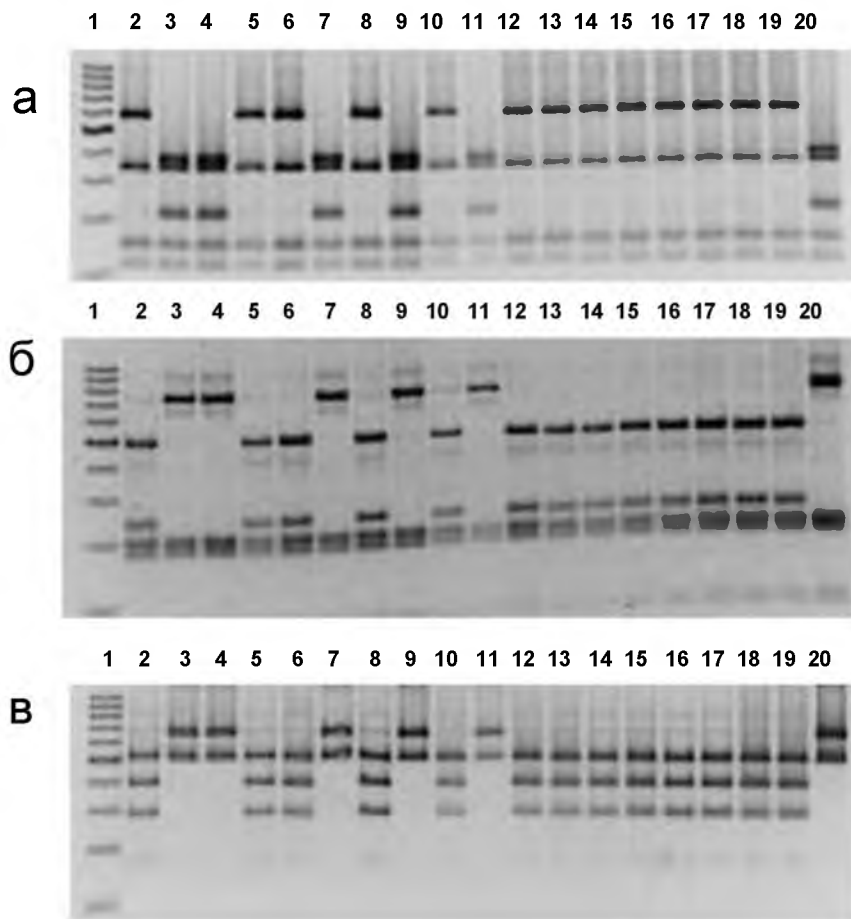


Рисунок. Электрофореграммы фрагментов, полученных после обработки ампликона QHL12D20 рестриктазами *HaeIII* (а), *BamHI* (б) и *HinfI* (в); 1 – маркер молекулярного веса, 2 – VIR101A, 3 – VIR349, 4 – VIR795, 5 – VIR818, 6 – VIR832, 7 – VIR339, 8 – VIR378, 9 – VIR452, 10 – VIR631, 11 – VIR632, 12 – VIR684, 13 – VIR703, 14 – VIR734, 15 – VIR763, 16 – VIR821, 17 – VIR823, 18 – VIR825, 19 – VIR682, 20 – VIR649

Figure. Electrophoregrams of fragments obtained after treatment of the QHL12D20 amplicon with restrictases *HaeIII* (а), *BamHI* (б) and *HinfI* (в); 1 – Molecular weight marker, 2 – VIR101A, 3 – VIR349, 4 – VIR795, 5 – VIR818, 6 – VIR832, 7 – VIR339, 8 – VIR378, 9 – VIR452, 10 – VIR631, 11 – VIR632, 12 – VIR684, 13 – VIR703, 14 – VIR734, 15 – VIR763, 16 – VIR821, 17 – VIR823, 18 – VIR825, 19 – VIR682, 20 – VIR649

В последние годы получили развитие методы ассоциативного анализа, который рассматривается в качестве мощного инструмента для поиска ценных аллелей генов, определяющих хозяйственно важные признаки. В частности, большие надежды возлагаются на результаты полногеномных ассоциативных исследований (genome-wide association studies – GWAS), направленные на

идентификацию в секвенированных геномах однонуклеотидных полиморфизмов, ассоциированных с аллельными различиями. Первые результаты в этой области получены и для подсолнечника (Mandel et al., 2013). Выявленные в настоящей работе ассоциации SNP в последовательностях гомологов *RFL-PPR*-генов и признаком восстановления фертильности пыльцы могут быть ис-

пользованы для идентификации еще не изученных генетических факторов, влияющих на проявление этого важного для селекции признака.

Таблица 3. Расщепление F₂ ВИР116А×ВИР740 по признаку фертильности пыльцы и наличию SCAR-маркеров HRG01 и HRG02

Table 3. Segregation of the F₂ hybrid VIR116A×VIR740 for pollen fertility trait and the presence of SCAR markers HRG01 and HRG02

Расщепляющиеся признаки	Фенотипические классы				Теоретическое соотношение	Всего растений	χ^2
	F, M	F, -	S, M	S, -			
Фертильность, маркер HRG01	91	5	34	3	9:3:3:1	133	23,88
Фертильность, маркер HRG02	81	5	35	2	9:3:3:1	123	24,55

$\chi^2_{0,05, 3} = 7,81$

По данным гибридологического анализа, в F₂ скрещивания ВИР116А×ВИР740 фрагмент QHL12D20 наследовался независимо от гена *Rfl* (табл. 4).

Таблица 4. Расщепление F₂ гибрида ВИР116А × ВИР740 по признаку восстановления фертильности пыльцы и наличию маркеров L12/*HaeIII*

Table 4. Segregation of the F₂ hybrid VIR116A × VIR740 for pollen fertility trait and presence of the L12/*HaeIII* markers

Расщепляющиеся локусы	Фенотипические классы						Всего растений	χ^2
	F, L12_1_2	F, L12_1	F, L12_2	S, L12_1_2	S, L12_1	S, L12_2		
<i>Rf</i> , QHL12D20	43	23	24	16	10	6	122	1,17

$\chi^2_{0,05, 3} = 7,81$

Примечание: F – фертильные растения, S – стерильные растения, L12_1 и L12_2 – варианты локуса QHL12D20

Выводы

Методом гибридологического анализа подтверждена высокая диагностическая ценность SCAR-маркеров HRG01 и HRG02 для идентификации носителей доминантного аллеля генам *Rfl*, отвечающего за признак восстановления пыльцы при ЦМС РЕТ1-типа у подсолнечника.

В геноме подсолнечника присутствуют по два варианта фрагментов гомологов *RFL-PPR*-генов QHL12D20 и B20M13, отличающиеся единичными нуклеотидными заменами (SNP), для идентификации которых

разработаны CAPS-маркеры. Варианты маркеров L12/*HaeIII*_1 и B20/*RsaI*_1 ассоциированы присутствием в генотипе доминантного аллеля *Rfl*, тогда как L12/*HaeIII*_2 и B20/*RsaI*_2 чаще обнаруживаются у носителей рецессивного. По результатам анализа F₂, локусы QHL12D20 и *Rfl* наследуются независимо.

RFL-PPR-гены могут служить источником молекулярно-генетических маркеров для паспортизации генофонда, молекулярного картирования, а также филогенетических исследований.

References/Литература

- Anisimova I. N., Alpatieva N. V., Timofeeva G. I. Screening of plant genetic resources using DNA markers: basic principles, DNA isolation, PCR, electrophoresis in agarose gels. Guidelines of VIR (Ed. by E. E. Radchenko). SPb.: VIR, 2010, 30 p. [in Russian] (Анисимова И. Н., Алпатьева Н. В., Тимофеева Г. И. Скрининг генетических ресурсов растений с использованием ДНК-маркеров: основные принципы, выделение ДНК, постановка ПЦР, электрофорез в агарозном геле: Методические указания ВИР // под ред. Е.Е. Радченко. СПб: ВИР. 2010. 30 с.).
- Anisimova I. N., Alpatieva N. V., Rozhkova V. T., Kuznetsova E. B., Pinaev A. G., Gavrilova V. A. Polymorphism among *RFL-PPR* homologs in sunflower (*Helianthus annuus* L.) lines with var-

- ying ability for the suppression of the cytoplasmic male sterility phenotype // *Rus. J. Genet.*, 2014a, vol. 50, no. 7, pp. 712–721. DOI: 10.1134/S1022795414070023.
- Anisimova I. N., Gavrilova V. A., Alpatieva N. V., Kuznetsova E. B., Karabitsina Yu. I., Rozhkova V. T. Sunflower collection in the studies of pollen fertility restoration genetic mechanisms // *Proceedings of applied botany, genetics and breeding*, 2014b, vol. 175, no. 4, pp. 72–82 [in Russian] (Анисимова И. Н., Гаврилова В. А., Алпатьева Н. В., Кузнецова Е. Б., Карабицина Ю. И., Рожкова В. Т. Коллекция подсолнечника в исследованиях генетических механизмов восстановления фертильности пыльцы // *Тр. по прикл. бот., ген. и сел.* 2014. Т. 175. № 4. С. 72–82).
- Dahan J., Mireau H. The *Rf* and *Rf*-like PPR in higher plants, a fast-evolving subclass of PPR genes // *RNA Biol.*, 2013, vol. 10, no. 9, pp. 1469–1476. DOI: 10.4161/rna.25568.
- Fujii S., Bond Ch. S., Small I. D. Selection patterns on restorer-like genes reveals a conflict between nuclear and mitochondrial genomes throughout angiosperm evolution // *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2011, vol. 108, no. 4, pp. 1723–1728. DOI: 10.1073/pnas.1007667108.
- Gavrilova V. A., Rozhkova V. T., Anisimova I. N. Sunflower genetic collection at the Vavilov Institute of Plant Industry // *Helia*, 2014, vol. 37, no. 60, pp. 1–16. DOI: 10.1515/helia-2014-0001.
- Horn R., Kusterer B., Lazarescu E., Prufe M., Friedt W. Molecular mapping of the *Rf1* gene restoring fertility in PETI- based F1 hybrids in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // *Theor. Appl. Genet.*, 2003, vol. 106, no. 4, pp. 599–606. DOI: 10.1007/s00122-002-1078-y.
- Ivanov M. K., Dymshits G. M. Cytoplasmic male sterility and restoration of pollen fertility in higher plants // *Rus. J. Gen.*, 2007, vol. 43, no. 4, pp. 354–368. DOI: 10.1134/S1022795407040023.
- Kaur P., Verma M., Chaduvula P. K., Saxena S., Baliyan N., Junaid A., Mahato A. K., Singh N. K., Gaikwad K. Insights into PPR gene family in *Cajanus cajan* and other legume species // *J. Data Mining Genomics Proteomics*, 2016 vol. 7, 203. DOI:10.4172/2153-0602.1000203.
- Leclercq P. Une sterilité cytoplasmique chez le tournesol // *Ann. Amélior. Plant.*, 1969, vol. 19, no. 3, pp. 99–106.
- Mandel J. R., Nambeesan S., Bowers J. E., Marek L. F., Ebert D., Rieseberg L. H., Knapp S. J., Burke J. M. // Association mapping and the genomic consequences of selection in sunflower. *Plos Genetics* **9**, 2013, e1003378. DOI: 10.1371/journal.pgen.
- Rieseberg L. H., Blackman B. K. Speciation genes in plants // *Annals of Botany*, 2010, vol. 106, no. 3, pp. 439–455. DOI: 10.1093/aob/mcq126.
- Schnabel U., Engelmann U., Horn R. Development of markers for the use of the PEF1 cytoplasm in sunflower hybrid breeding // *Plant Breed.*, 2008, no. 6, pp. 541–652.
- Sykes T., Yates S., Nagy I., Asp T., Small I., Studer B. *In silico* identification of candidate genes for fertility restoration in cytoplasmic male sterile perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) // *Genome Biol. Evol.* 2016:evw047. DOI: 10.1093/gbe/evw047.
- Yue B., Miller J. F., Hu J. Experimenting with marker assisted selection in confection sunflower germplasm enhancement / *Proceeding of 29th Sunflower Research Forum*, January 2007. Fargo, ND. <http://www.sunflowerusa.com/research/research-workshop/>.
- Yue B., Vick B. A., Cai X., Hu J. Genetic mapping for the *Rf1* (fertility restoration) gene in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by SSR and TRAP markers // *Plant Breed.*, 2010, vol. 129, no. 1, pp. 24–28. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2009.01661.x.